

10/525717  
Rec'd PTO 25 FEB 2005 #2  
PCT/JP03/10957

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

28.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 8月30日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-255141  
[ST. 10/C]: [JP2002-255141]

出 願 人  
Applicant(s): 山之内製薬株式会社

REC'D 17 OCT 2003

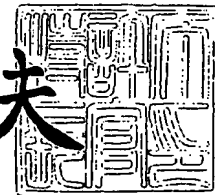
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2003-3080982

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 000003177

【提出日】 平成14年 8月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 17/14

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区小豆沢1-1-8 山之内製薬株式会社内

【氏名】 永井 浩二

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 谷口 昌要

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 新堂 信昭

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 寺田 央

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 森 政道

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 網野 伸明

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 鈴木 謙一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区小豆沢1-1-8 山之内製薬株式会社内

【氏名】 高橋 勇夫

## 【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区小豆沢 1 - 1 - 8 山之内製薬株式会社内

【氏名】 天瀬 光雄

## 【特許出願人】

【識別番号】 000006677

【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100089200

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 長井 省三

【電話番号】 03-5916-5530

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100098501

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 拓

【電話番号】 03-5916-5528

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100109357

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【電話番号】 03-5916-5530

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005348

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

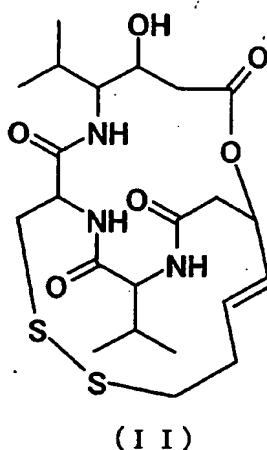
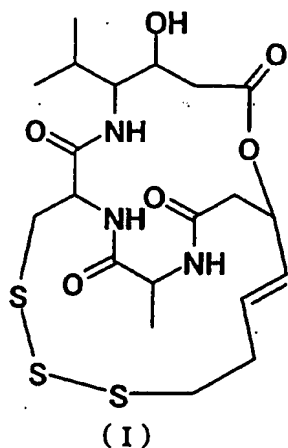
【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なデプシペプチド化合物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下式 (I) 又は (II) で示されるデプシペプチド化合物  
またはその製薬学的に許容される塩。

【化1】



【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は医薬、殊にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤及び抗腫瘍剤として有用な、新規なデプシペプチド化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒストンのアセチル化はヒストンアセチル化酵素（ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(Histone Acetyltransferase); HAT) とヒストン脱アセチル化酵素（ヒストンデアセチラーゼ(Histone Deacetylase); HDAC) とのバランスによって制御されていることが知られており、近年、いくつかのHAT並びに HDACが同定されその転写調節における重要性が報告されている (Ogryzko, V.V. et al Cell 87, 953-959, 1996, Brown, C.E. et al Trends Biochem.Sci. 25(1), 15-19, 2000, Grozinger, C.M. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96, 4868-4873, 1999)。

## 【0003】

一方で、細胞周期停止、形質転換細胞の形態正常化、分化誘導など多彩な作用を有する酪酸は、細胞内に高アセチル化ヒストンを蓄積させ、HDAC阻害作用を有することが以前より知られていた (Counsens, L.S. et al J.Biol.Chem. 254, 1716-1723, 1979)。また、微生物代謝産物のTrichostatin A (TSA)は細胞周期の停止、分化誘導を示し (Yoshida, M. et al Cancer Res 47, 3688-3691, 1987, Yoshida, M. et al Exp.Cell Res 177, 122-131, 1988)、アポトーシスを誘導することが見出された。TSAは細胞内に高アセチル化ヒストンを蓄積させ、部分精製したHDACを用いた検討からTSAが強力なHDAC阻害剤であることが明らかとなった (Yoshida, M. et al J.Biol.Chem. 265, 17174-17179, 1990)。

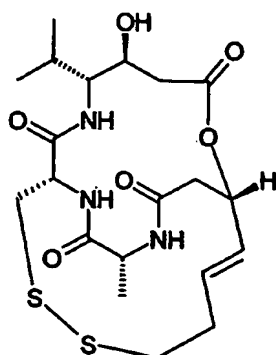
## 【0004】

HDAC阻害剤は、細胞周期停止、形質転換細胞の形態正常化、分化誘導、アポトーシス誘導、血管新生阻害作用などを有することから、抗腫瘍剤としての効果が期待されている (Marks, P.A. et al J.Natl.Cancer Inst., 92, 1210-1216, 2000, Kim, M.S. et al Nature Med. 7 437-443, 2001)。またその他にも、例えば感染症、自己免疫疾患、皮膚病 (Darkin-Rattray, S.J. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93, 13143-13147, 1996) などの細胞増殖性疾患の治療・改善薬、またハンチントン病などの進行性神経変性疾患の予防・治療薬 (Steffan, J.S. et al Nature 413, 739-743, 2001)、導入遺伝子の発現亢進 (Chen, W.Y. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94, 5798-5803, 1997) など様々な応用も試みられており、有用な医薬となることが期待されている。

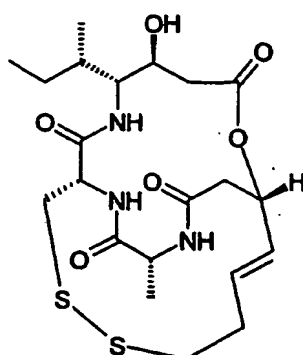
近年になって、HDAC阻害作用を有する微生物培養物由来のデプシペプチド化合物、例えば、FK228 (Nakajima, H. et al. Exp. Cell Res. 241, 126-133, 1998)、及び下式で示される化合物A, B並びにC (W000/42062号公報及び特開2001-348340号公報) の報告がある。これらの化合物は良好なHDAC阻害作用を有し、新しいタイプの抗腫瘍剤として期待されている。

## 【0005】

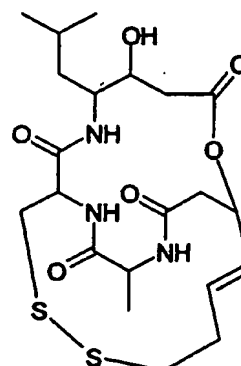
## 【化2】



化合物A



化合物B



化合物C

しかしながら、今なお、活性強度、安定性、体内動態や毒性などの更に改善された薬剤の創製が切望されている。

## 【0006】

## 【発明を解決しようとする課題】

本発明は、HDACの関与する疾患、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患の予防若しくは治療剤として有用な新規化合物の提供を目的とするものである。

## 【0007】

## 【課題を解決する方法】

本発明者等は、天然に存在する多くの微生物が産生する化合物につき、鋭意検討した結果、シュードモナス属に属する新種の微生物Q71576株を見だし、該培養物から優れたヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有する新規なデブシペプチド化合物（前出の化合物A、B及びC）を単離した。そして、これらの化合物が優れたHDAC阻害作用を有することを知見して、先に特許出願を行った（W000/42062号公報及び特開2001-348340号公報）。

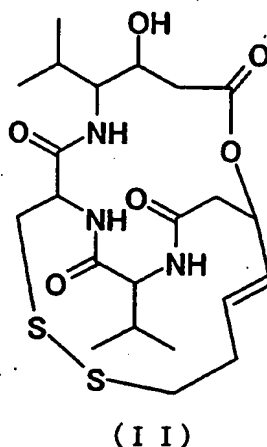
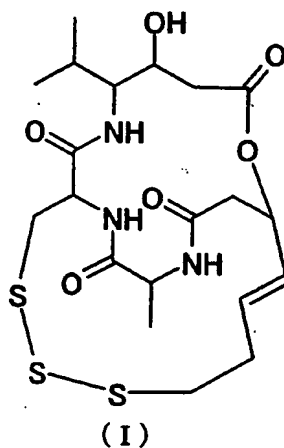
本発明者等は、更に微生物Q71576株の培養物中の微量成分を単離すべく、培養条件並びに精製条件等の検討を鋭意行い、優れたHDAC阻害作用並びにヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有する新規な類縁体化合物を単離することに成功し、本発明を完成した。

## 【0008】

即ち、本発明は、HDAC阻害剤及び抗腫瘍剤として有用な、下式（I）で示され

るデブシペプチド化合物（化合物Qと略記する）又は下式（I I）で示されるデブシペプチド化合物（化合物Rと略記する）またはその製薬学的に許容される塩に関する。

【化3】



【0009】

以下、本発明につき詳述する。

本発明デブシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩はシュードモナス属（*Pseudomonas*）に属する当該化合物生産菌を栄養培地にて培養し、当該化合物を蓄積させた培養物から常法によって得られる。当該化合物の製造方法において使用する微生物は、シュードモナス属に属し当該化合物の生産能を有する微生物であればいずれも用いることができる。このような微生物としては、例えば、長野県北佐久郡望月町で採集された土壌より分離されたシュードモナス属に属する細菌シュードモナス エスピー（*Pseudomonas* sp.）Q71576株を挙げることができる。本菌株の菌学的性状はW000/42062号公報に記載の通りである。なお、本菌株はシュードモナス エスピー（*Pseudomonas* sp.）Q71576として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-6944号（寄託日1999年1月8日）として国際寄託されている。また、微生物は人工的に又は自然に変異を起こしやすいので、本発明において用いられるシュードモナス エスピー（*Pseudomonas* sp.）Q71576株は、天然から分離された微生物の他に、これに紫外線、X線、化学薬剤などで人工的に変異させたもの及びそれらの天然変異株

についても包含する。

#### 【0010】

##### (製造方法)

本発明化合物はシュードモナス属に属し、本発明化合物生産能を有する微生物を培養することによって得られる。培養は一般微生物の培養方法に準じて行われる。

培養に用いられる培地としては、シュードモナス エスピー Q71576株が利用する栄養源を含有する培地であればよく、合成培地、半合成培地または天然培地が用いられる。培地に添加する栄養物として公知のものを使用できる。培地の組成は、例えば炭素源としてはD-グルコース、D-マンノース、D-フルクトース、イノシトール、D-マンニトール、D-ガラクトース、トレハロース、キサンチン、デンプン、ブドウ糖、デキストリン、グリセリン、植物油等が挙げられる。窒素源としては肉エキス、ペプトン、グルテンミール、綿実粕、大豆粉、落花生粉、魚粉、コーンステープリカー、乾燥酵母、酵母エキス、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿酸その他の有機、無機の窒素源が用いられる。また、金属塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、鉄、コバルトなどの硫酸塩、硝酸塩、炭酸塩、リン酸塩などが必要に応じて添加される。さらに、必要に応じてメチオニン、システイン、シスチン、チオ硫酸塩、オレイン酸メチル、ラード油、シリコン油、界面活性剤などの生成促進化合物または消泡剤を添加することもできる。

#### 【0011】

培養条件としては好氣的条件下で培養するのが一般的に有利で、培養温度は3～32℃の範囲、好ましくは20～28℃付近で行われる。培地のpHは約4.5～9、好ましくは約5～7.5の範囲に調整すると好結果が得られる。培養期間は培地の組成、温度条件に応じて適宜設定されるが、通常1～10日程度、好ましくは2～7日程度である。

#### 【0012】

培養物より目的とする本発明化合物を単離するには、微生物が産生する代謝産物に用いる通常の抽出、精製の手段が適宜利用できる。例えば培養化合物中の該



化合物は培養液をそのままか、又は遠心分離あるいは培養物に濾過助剤を加えて濾過して得られた培養液に酢酸エチル等の水と混和しない有機溶剤を加えて抽出する。また、培養液を適宜の担体に接触させ、濾液中の生産化合物を吸着させ、次いで適当な溶媒で溶出することにより該化合物を抽出することができる。例えば、アンバーライト（登録商標）XAD-2、ダイヤイオン（登録商標、以下同じ）HP-20、ダイヤイオンCHP-20、又はダイヤイオンSP-900のような多孔性吸着樹脂に接触させて該化合物を吸着させる。次いでメタノール、エタノール、アセトン、ブタノール、アセトニトリル又はクロロホルム等の有機溶媒を単独若しくは混合した溶媒を、又は当該溶媒と水の混合液を用いて該化合物を溶出させる。このときの有機溶媒の混合比率を低濃度より段階的に又は連続的に高濃度まで上げていくことにより、該化合物を含む画分を効率よく得ることができる場合がある。酢酸エチル、クロロホルム等の有機溶媒で抽出する場合には、培養濾液にこれらの溶媒を加え、良く振盪し、該化合物を抽出する。次に、上記の各操作法を用いて得た該化合物含有画分は、シリカゲル、ODS等を用いたカラムクロマトグラフィー、遠心液々分配クロマトグラフィー、ODSを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、再結晶等の定法により、さらに純粋に分離精製することができる。

#### 【0013】

本発明デブシペプチド化合物の製薬学的に許容される塩としては、無機若しくは有機塩基との塩であり、具体的にはナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウムなど無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミンなどの有機塩基、リジン、オルニチンなどの塩基性アミノ酸との塩、あるいは、鉄などとの錯塩等を挙げることができる。

また、本発明化合物は不斉炭素原子及び二重結合を有するので、これに基づく立体異性体（ラセミ体、光学異性体、ジアステレオマー等）及び幾何異性体（シス体又はトランス体）が存在する。従って本発明化合物は、これらの立体異性体又は幾何異性体の混合物もしくは単離されたものを包含する。

さらに、本発明は、当該化合物の水和物または各種溶媒和物や、当該化合物の結晶多型も包含する。

## 【0014】

## 【発明の効果】

本発明化合物は、後記試験例に示すように、HDAC阻害作用を有し、またヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を示すことが確認された。従って、本発明化合物は、ヒストンのアセチル化の関与する疾患や病態、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患、さらにはハンチントン病などの進行性神経変性疾患の予防・治療薬の治療及び改善に有用である。ここに、細胞増殖性疾患としては、例えば、感染症、自己免疫疾患、皮膚病が挙げられる。特に本発明化合物は良好なヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有することから、抗腫瘍剤として有用である。更に、本発明化合物は遺伝子治療におけるベクター導入の効率化や導入遺伝子の発現亢進にも有用である。

## 【0015】

本発明化合物の有用性は以下の試験により確認されたものである。

## 試験例 1: HDAC阻害試験

## 【0016】

## (1) HDACの部分精製

ヒト白血病由来K562細胞より単離した核を吉田らの方法 (Yoshida, M. et al J. Biol. Chem. 265, 17174-17179, 1990) に従って抽出し、その抽出液をQ Sepharose FFカラム (ファルマシア社; 17-0510-01) を用い、0-0.5MのNaClの濃度勾配によりHDACの部分精製を行った。その後、HDA緩衝液 [15mMリン酸カリウム (pH 7.5)、5%グリセロール、0.2mM EDTA] で透析を行った。

## (2) HDAC阻害活性の測定

Nare, B. et al Anal. Biochem. 267, 390-396, 1999に従って合成された、ビオチン化 [<sup>3</sup>H] アセチルヒストンH4ペプチド (aa 14-21: Biotin-Gly-Ala-[<sup>3</sup>H-acetyl]Lys-Arg-His-Arg-[<sup>3</sup>H-acetyl]Lys-Val-amide (Amersham Pharmacia Biotech社)、以下 [<sup>3</sup>H] アセチルヒストンと略記する。) をHDAC阻害アッセイの基質として使用した。

[<sup>3</sup>H] アセチルヒストンを60  $\mu$ M ジチオスレイトール(DTT)を含むHDA緩衝液で37  $\mu$ Mに希釈しこれを25  $\mu$ lと、(1) で精製・透析したHDAC画分25  $\mu$ lとを混合し

室温にて2時間反応させた後、1M塩酸を50 $\mu$ l添加して反応を停止させ、さらに酢酸エチル800 $\mu$ lを加え混合・遠心を行い、酢酸エチル層400 $\mu$ lをシンチレーターバイアルに採取し、5mlのシンチレーターを添加して遊離した [ $^3$ H] 酢酸の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

基質と酵素とを混合する前に予めジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解・希釈した薬物を2 $\mu$ l添加し、上記のアッセイを行うことで、薬物のHDACに対する阻害活性を検討した。

本発明の化合物Q及びRは良好なHDAC阻害活性を示し、それぞれ10nMの濃度において50%以上のHDAC酵素阻害活性を示した。

#### 【0017】

##### 試験例2：ヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制試験

96穴テストプレート中にヒト大腸癌由来WiDr細胞、あるいはヒト白血病由来K562細胞を5 $\times 10^3$ 個/wellになるよう播種し、37 $^{\circ}$ C、0.5% CO $_2$ インキュベーター中で培養した。18時間後、培地で希釈した溶媒(DMSO)および種々の濃度の化合物Q又はRを添加し37 $^{\circ}$ C、0.5% CO $_2$ インキュベーター中でさらに72時間培養した。培養後、細胞の増殖をAlamar Blue (BIOSOURCE社)を用いて測定し、0.1% DMSO添加・細胞ありおよび0.1% DMSO添加・細胞なしの条件の測定値をそれぞれ0%阻害、100%阻害として化合物各濃度の増殖阻害%を求め、増殖を50%阻害する濃度(IC $_{50}$ 値)をlogistic回帰により算出した。その結果、化合物QのWiDr及びK562細胞に対する細胞増殖阻害のIC $_{50}$ 値はそれぞれ3.0nM及び1.4nM、また、化合物RのWiDr及びK562細胞に対する細胞増殖阻害のIC $_{50}$ 値はそれぞれ0.9nM及び0.6nMであり、良好な細胞増殖阻害作用を有していた。

#### 【0018】

##### 試験例3：ヒト癌細胞に対するヒストンアセチル化誘導作用

35mmディッシュ中にK562細胞を1.5 $\times 10^6$ 個/ディッシュになるよう播種し、その後、溶媒(DMSO)および種々の濃度(0.3~30 nM)の化合物Q又はRを添加し、37 $^{\circ}$ C、0.5% CO $_2$ インキュベーター中で24時間培養した。ヒストン蛋白質の抽出は以下の方法で行った。遠心分離により回収した細胞沈殿物にTEN buffer (10 mM Tris HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1 tablet / 10mL Complete mini (

Roche社))を添加し、氷上で10分間放置後、遠心分離により上清を回収し、等量の0.4 M硫酸をよく混合し氷上で1時間放置した。遠心分離により上清部分を回収後、5倍量のアセトンと混合し-20℃で12時間以上放置した後、沈殿物を遠心分離により回収しアセトンで一度洗浄した沈殿物を乾燥した。これを蒸留水で溶解したものをヒストン蛋白質とし、蛋白質濃度をブラッドフォード法にて定量した。ヒストン蛋白質は等量に揃えて定法に従いSDS-PAGE、ウェスタンブロットを行った。一次抗体には抗アセチル化ヒストンH3抗体 (UPSTATEbiotechnology社) を、二次抗体にはHRP標識抗ウサギ抗体 (Amersham Pharmacia Biotech社) を使用し、ECL (Amersham Pharmacia Biotech社) にて発光を検出した。結果、化合物Q又はR処理サンプルでは溶媒処理サンプルに比較して顕著で且つ用量依存的なアセチル化ヒストンH3のバンドが検出されたことから、本発明の化合物Q及びRはK562細胞内においてもHDACを阻害しヒストンのアセチル化を亢進させていることが確認された。

#### 【0019】

以下に本発明化合物を有効成分として含む医薬組成物の製造方法と使用方法を詳述する。

本発明のデプシペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩の1種又は2種以上を有効成分として含有する医薬組成物は、通常用いられている製剤用の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、液剤、注射剤、坐剤、軟膏、貼付剤等に調製され、経口的又は非経口的に投与される。

本発明化合物のヒトに対する臨床投与量は、通常経口投与の場合、1日の投与量は、体表面積当たり約1から10000mg/m<sup>2</sup>、好ましくは10~5000mg/m<sup>2</sup>が適当であり、これを1回あるいは2乃至4回に分けて投与する。静脈投与される場合は、1日の投与量は、体表面積当たり約0.1から1000mg/m<sup>2</sup>が適当で、1日1回乃至複数に分けて投与する。投与量は症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に依じて適宜決定される。

#### 【0020】

本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が

用いられる。このような固体組成物においては、一つ又はそれ以上の活性化合物が、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤や繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、安定化剤、溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣または胃溶性あるいは腸溶性化合物のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剤的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エチルアルコールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に溶解補助剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

#### 【0021】

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えば注射剤用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エチルアルコールのようなアルコール類、ポリソルベート 80（商品名）等がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解補助剤のような添加剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。これらはまた、無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

#### 【0022】

本発明化合物の溶解性が低い場合には、可溶化処理を施してもよい。可溶化処理としては、医薬製剤に適用できる公知の方法、例えば界面活性剤（ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油類、ポリオキシエチレンソルビタン高級脂肪酸エステル類

、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ショ糖脂肪酸エステル類等)を添加する方法、薬物と可溶化剤例えば高分子(ハイドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリエチレングリコール(PEG)等の水溶性高分子、カルボキシメチルエチルセルロース(CMEC)、ハイドロキシプロピルメチルセルロースフタレート(HPMCP)、メタアクリル酸メチルメタアクリル酸共重合体(オイドラギットL、S、商品名;ローム・アンド・ハース社製)等の腸溶性高分子)との固体分散体を形成する方法が挙げられる。更に必要により、可溶性の塩にする方法、サイクロデキストリン等を用いて包接化合物を形成させる方法等も採用できる。可溶化の手段は、目的とする薬物に応じて適宜変更できる[「最近の製剤技術とその応用I」、内海勇ら、医薬ジャーナル157-159(1983)及び「薬学モノグラフNo.1、生物学的利用能」、永井恒司ら、ソフトサイエンス社、78-82、(1988)参照]。

### 【0023】

#### 【実施例】

以下、実施例にて具体的に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

グルコース10g、ポテトスターチ20g、ポリペプトン5g、酵母エキス5g、炭酸カルシウム4g、蒸留水1Lを含む培地(pH 7.0) 100mLを、500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。ベネット寒天培地に良く生育させたシュードモナス エスピー Q71576株を掻き取って接種し、28℃、200回転/分の条件で3日間振盪培養し、種培養液とした。次にマンニット40g、ポリペプトン5g、肉エキス5g、硫酸マグネシウム七水和物2g、L-システイン塩酸塩一水和物0.5g、水道水1Lを含む培地(pH5.0)を100mLずつ500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。この培地に前記種培養液を2mLずつ接種し、24℃、220回転/分の条件で3日間振盪培養した。

このようにして培養した培養液1Lについて、6000rpmで10分間遠心分離を行った。上清液を1M塩酸でpH3.0に調整して、酢酸エチルにて抽出し、無水硫酸ナトリウムを添加して脱水した後、減圧下で濃縮乾固した。この油状の粗抽出物をメ

タノールに溶解して、STR-PREP-ODS-M (20×250mm) 及びアセトニトリル/水 (30/70) を用いたHPLC (流速9ml/min) に繰り返し付し、保持時間28分から36分の画分1を得た。画分1を減圧下で濃縮乾固し、メタノールに溶解した後、さらにC0. SMOSIL (20×250mm) 及びアセトニトリル/0.25%トリフロロ酢酸水 (40/60) を用いたHPLC (流速9ml/min) を行い、保持時間15.2分のピークの画分2と保持時間16.5分のピークの画分3を得た。画分2を濃縮乾固することにより化合物Q 5.6mgを、画分3を濃縮乾固することにより化合物R 11.8mgを得た。

#### 【0024】

#### 実施例 2

グルコース10g、ポテトスターチ20g、ポリペプトン5g、酵母エキス5g、炭酸カルシウム4g、蒸留水1Lを含む培地 (pH 7.0) 100mLを、500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。ベネット寒天培地に良く生育させたシュードモナス エスピー Q71576株を掻き取って接種し、28℃、200回転/分の条件で3日間振盪培養し、第一段種培養液とした。次に上記と同様の培地500mLを3L容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。これに第一段種培養液を2%の割合で接種し、28℃、200回転/分の条件で3日間振盪培養し、第二段種培養液とした。次に本培養は、300L容ジャーファーマンターにマンニット50g、ポリペプトン5g、肉エキス5g、硫酸マグネシウム七水和物2g、L-シスチン0.5g、L(-)-プロリン0.5g、水道水1Lを含む培地 (pH5.0) 200Lを仕込み、120℃で20分間滅菌した。これに第二段種培養液を1%の割合で接種し、20℃、40回転/分、毎分20Lの通気量の条件で7日間培養した。

このようにして培養した培養液200Lを硫酸でpH 3.0に調整し、シャープレス遠心機で菌体と上清液とに分離した。この上清液を20LのダイヤイオンHP-20 (三菱化学工業社製) を充填した外径18cm、高さ150cmのカラムを通導させて、目的化合物等を吸着させた。次いで50Lの水道水で水洗した後、30%メタノール水40L、続いて30%アセトン水100Lで洗浄して、最後にメタノール60Lを用いて目的化合物を溶出した。この溶出液に5Lの蒸留水を加えて、減圧下で濃縮してメタノールを除去した。これに等量の酢酸エチルを加えて、pH 3.0で酢酸エチル抽出を3回行った。酢酸エチル抽出液に無水硫酸ナトリウムを添加して脱水した後、減圧下

で濃縮乾固し、目的化合物を含有する粗精製物を得た。

このようにして得た粗精製物21.5gをYMC PACK Pro C18 20×250mm (YMC)及びアセトニトリル/水 (40/60) を用いたHPLC (流速8ml/min) に繰り返し付し、保持時間18.0分から19.8分の画分1を得た。画分1は水溶液となるまで濃縮後、凍結乾燥し、さらにYMC PACK Pro C18 20×250mm (YMC)及びメタノール/水 (60/40) を用いたHPLC (流速10ml/min) に繰り返し付し、画分2 (保持時間17.6分) 及び画分3 (保持時間21.2分) を得た。画分2は水溶液となるまで濃縮後、凍結乾燥することにより化合物Q 80mgを得た。画分3は水溶液となるまで濃縮後、凍結乾燥したものをエタノールで再結晶することにより化合物R 287mgを得た。

#### 【0025】

本発明化合物の物理化学的性状

上記の実施例で得られた化合物Q及びRの物理化学的性状を下表に示す。また、NMRチャートを図1～4に示す。

#### 【0026】

【表1】

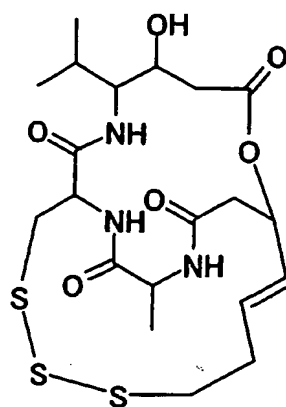
|   | 化合物Q  | 化合物R  |
|---|---|---|
| 色及び形状   | 白色粉末  | 白色粉末  |
| 比旋光度 $[\alpha]^{25}_D$                        | $-349.3^\circ$ (c 0.05, MeOH)               | $-65.3^\circ$ (c 0.20, MeOH)                          |
| 分子式   | $C_{20}H_{31}N_3O_6S_3$                     | $C_{22}H_{35}N_3O_6S_2$                               |
| 高分解能質量分析(FAB)                                 |   |   |
| 実験値   | 506.1442 (M+H) <sup>+</sup>                 | 502.2059 (M+H) <sup>+</sup>                           |
| 計算値   | 506.1453                                    | 502.2046  |
| 紫外可視吸収スペクトラム<br>$\lambda_{max}^{MeOH}$ nm (ε) | 265 (1600)                                  | End absorption  |
| 赤外吸収スペクトラム<br>$\nu_{max}$ (KBr) $cm^{-1}$     | 3320、2960、2930、<br>1660、1550、1510、<br>1430、 | 3380、3330、2960、2930、<br>1740、1670、1540、1520、<br>1430、 |

#### 【0027】

上記の物理化学的性状から化合物Q及びRの化学構造式を下記の如く決定した。

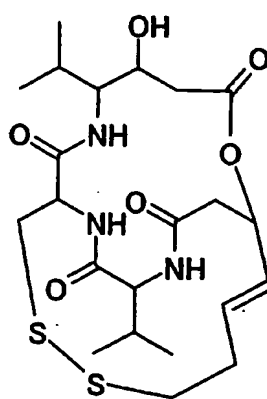


【化4】



化合物 Q

【0028】



化合物 R

【配列表】

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd.

<120> Novel Depsipeptide Compounds

<130> 000003177

<160> 1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Nagai, Kouji; Taniguchi, Masatoshi; Shindou, Nobuaki

Inventor: Terada, Yoh; Mori, Masamichi; Amino, Nobuaki

Inventor: Suzumura, Kenichi; Takahashi, Isao; Amase, Mitsuo

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (3)

<223> N<sup>6</sup>-[<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]acetyllysine

<222> (7)

<223> N<sup>6</sup>-[<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]acetyllysine

<400>

Gly Ala Xaa Arg His Arg Xaa Val

1

5

【0029】

【図面の簡単な説明】

【図1】 化合物Qの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。

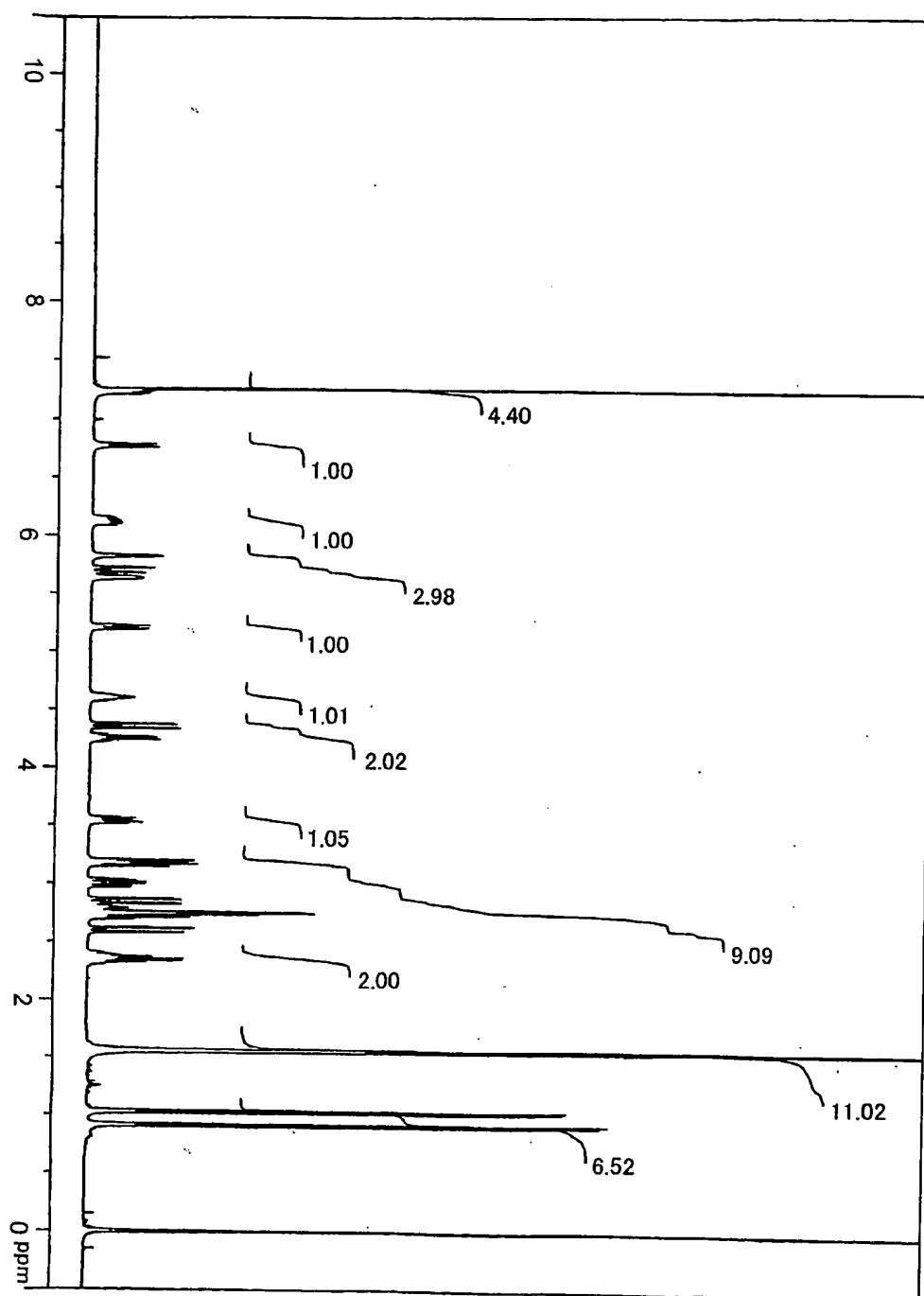
【図2】 化合物Qの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。

【図3】 化合物Rの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。

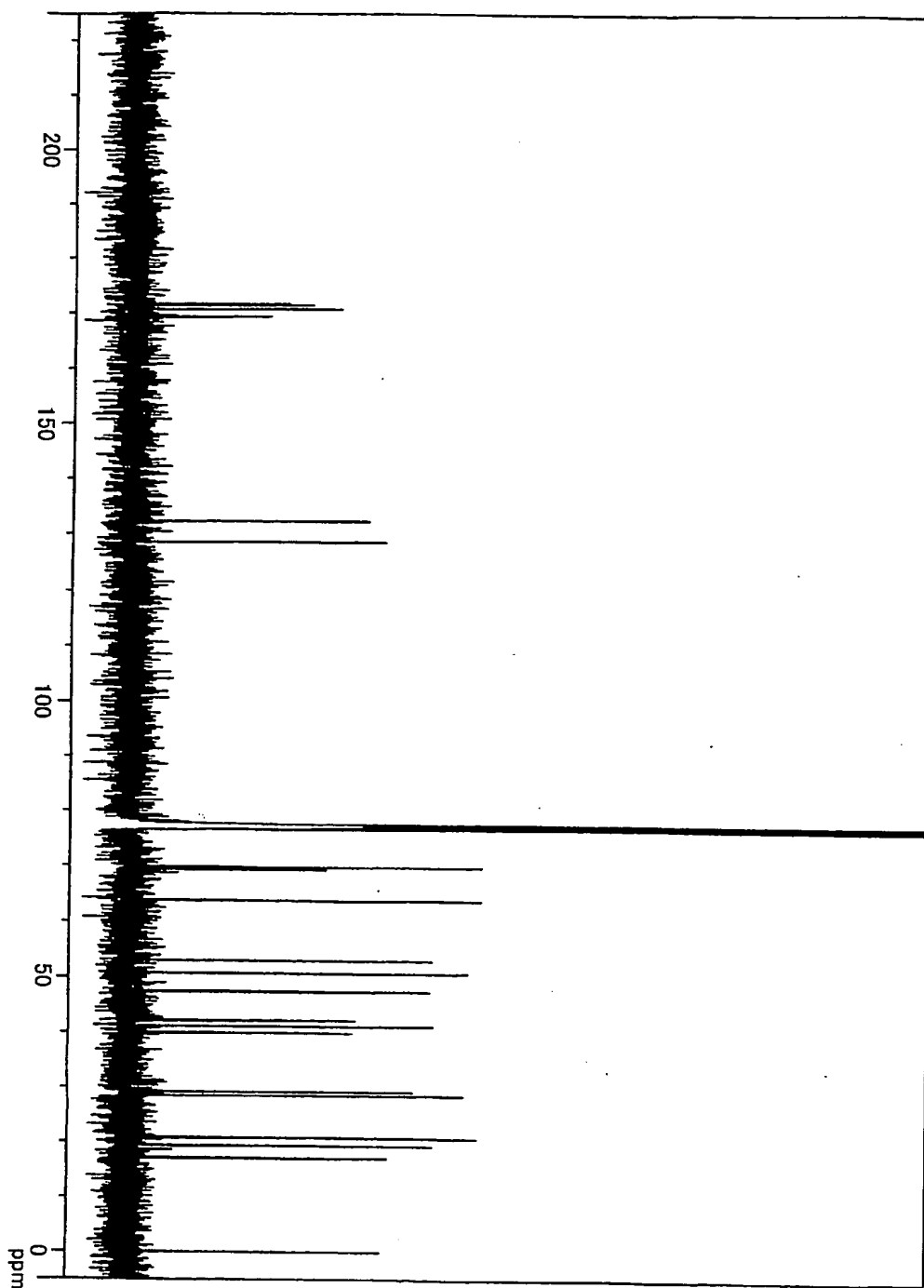
【図4】 化合物Rの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。

【書類名】 図面

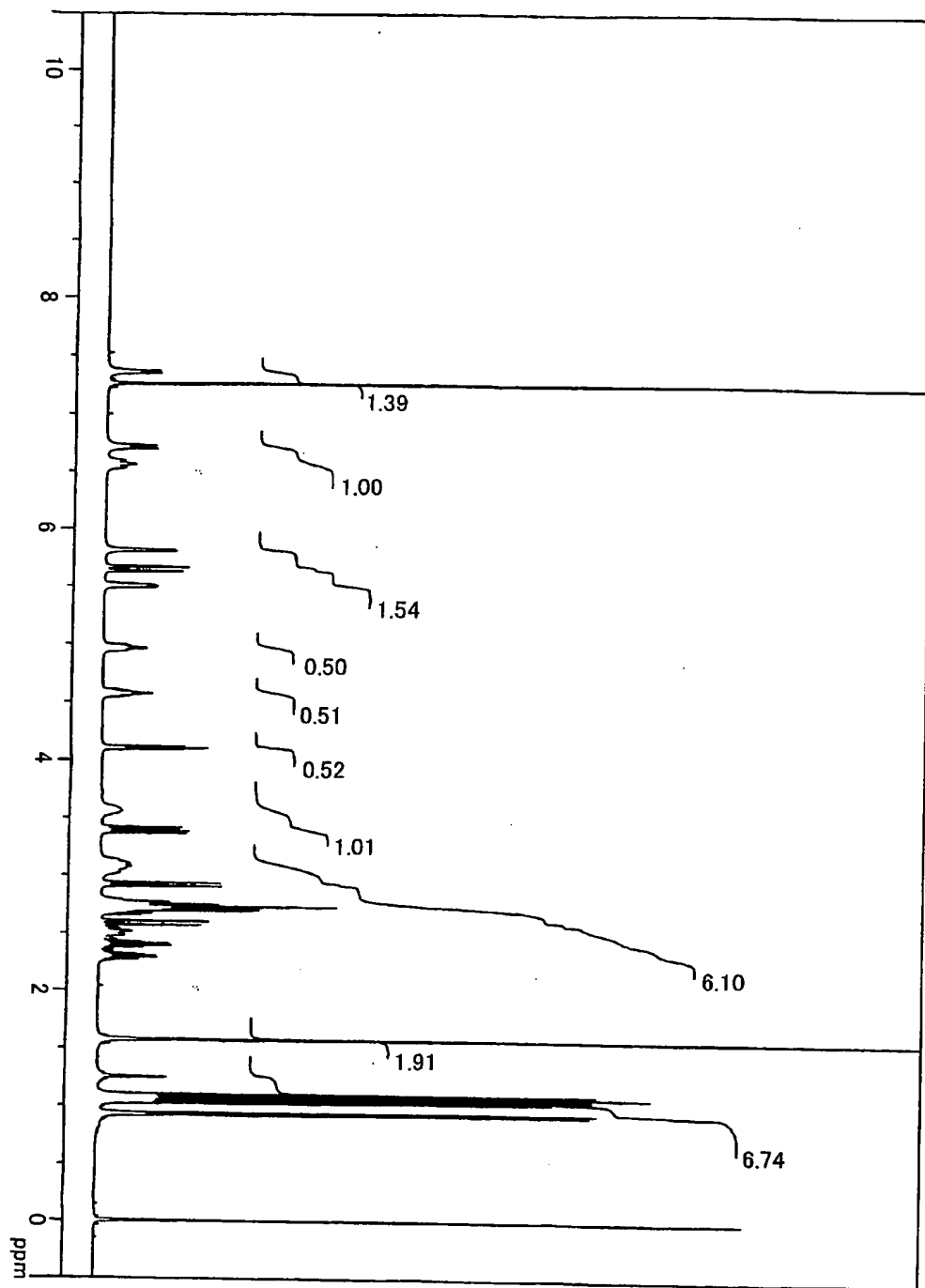
【図 1】



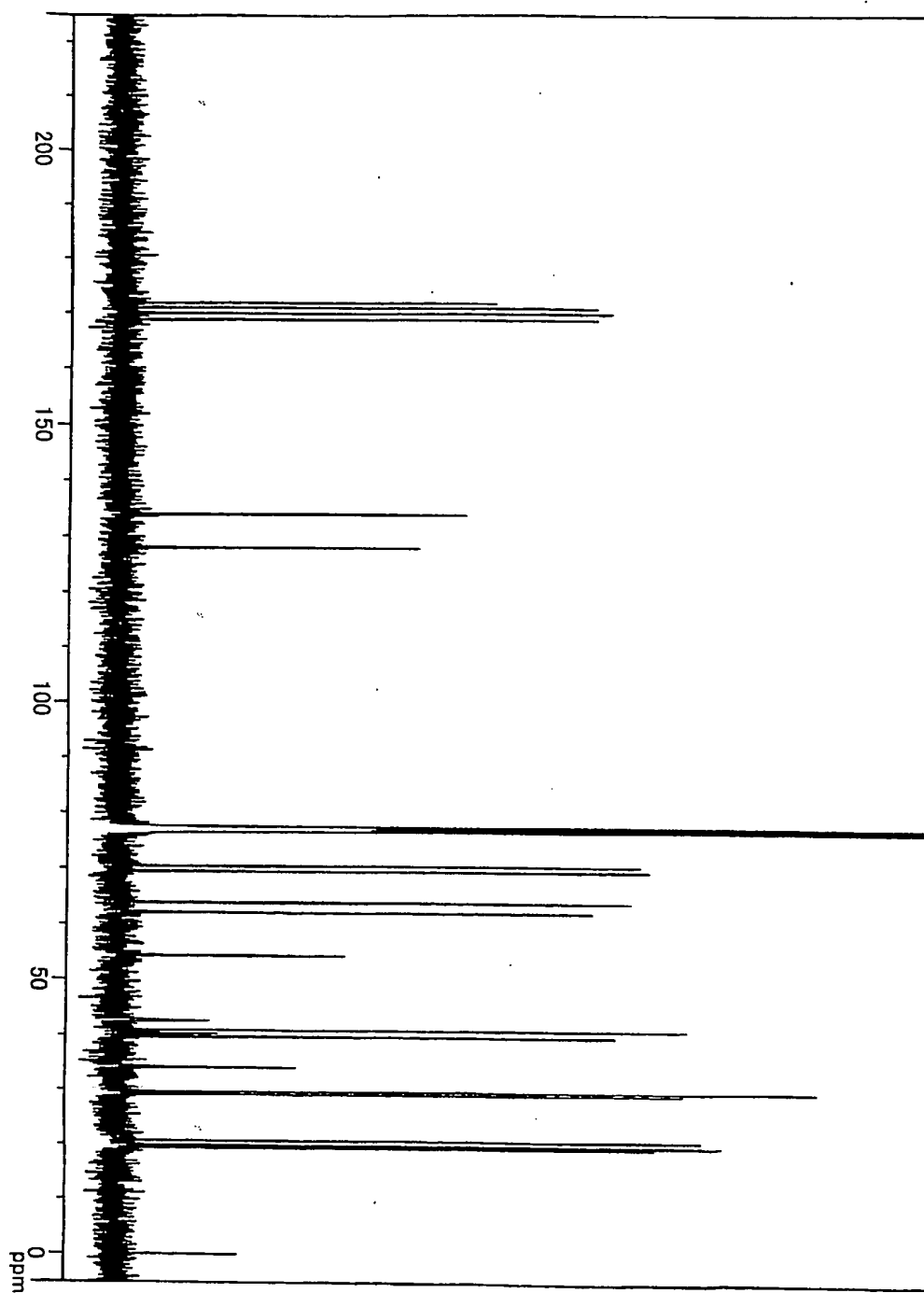
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 HDACの関与する疾患、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患の予防若しくは治療剤として有用な新規化合物の提供。

【解決手段】

本発明のデブシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩は、良好なHDAC阻害作用並びにヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有し、ヒストンのアセチル化の関与する疾患や病態、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患の治療及び改善に有用である。

【選択図】 無し

特願 2002-255141

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**